

ДОСЛІДЖЕННЯ IN VITRO КЛІТИННИХ ЕФЕКТІВ ЕМУЛЬГОВАНОЇ СИЛІКОНОВОЇ ОЛІЇ ПІСЛЯ ОПЕРАЦІЙ З ПРИВОДУ ВІДШАРУВАННЯ СІТКІВКИ У ПАЦІЄНТІВ З МІОПІЄЮ ВИСОКОГО СТУПЕНЯ

Литвинчук Л.М.¹, Сергієнко А.М.¹, Лаверенчук Г.Й.²

¹ Київська міська клінічна офтальмологічна лікарня “Центр мікрохірургії ока”, м. Київ, Україна

² Державна установа “Науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, м. Київ, Україна

Ключові слова: “силіконова” глаукома, міопія високого ступеня, бульбашки емульгованої силіконової олії, культура клітин лінії L929, фагоцитоз, клітини трабекули.

Вступ

Вторинна “силіконова” глаукома є одним з найгірших ускладнень емульгації силіконової олії (СО) після оперативних втручань з приводу відшарування сітківки у пацієнтів з міопією високого ступеня (МВС).

При емульгації СО подрібнюється на бульбашки, більше 60% яких мають в діаметрі розмір 0,1 мкм та менше. Дрібні, невидимі при гоніоскопії, бульбашки легко проникають через отвори трабекулярної сітки та заповнюють просвіт трабекули, викликаючи при цьому вторинну гіпертензію, часто стійку до медикаментозної терапії. При МВС через особливості анатомічних співвідношень структур переднього відрізка ока навіть незначні порушення відтоку вологи передньої камери можуть призвести до підвищення внутрішньоочного тиску та викликати глаукоматозні зміни [7]. Клітини трабекули, які є основною структурною одиницею трабекулярної сітки, одні з перших контактують з бульбашками силікону при емульгації СО.

Дослідження взаємодії часточок емульгованої СО із структурами трабекулярної системи на клітинному рівні залишається актуальним.

Мета роботи: дослідити в умовах експерименту клітинні ефекти бульбашок емульгованої СО на культурі клітин лінії L929, як моделі клітини in vitro.

Матеріали і методи.

Для дослідження було взято 12 зразків зависів бульбашок емульгованої СО при промиванні передньої камери після операцій з приводу відшарування сітківки у пацієнтів з МВС (передньозадня вісь становила від 27,6 до 32,08 мм). Експериментальні дослідження проводилися на культурі перещеплених клітин (лінія L929), які були обрані для дослідження як модель проліферуючої вітальної клітини in vitro. Культивування клітин з зависами бульбашок емульгованої СО здійснювали за загальноприйнятими методами роботи з культуральними штамами [2] у поживному середовищі такого складу: середовище RPMI-1640 (90%), ембріональна теляча сироватка (10%) та гентаміцин із

розрахунку 10 мкг/мл. Клітинні ефекти оцінювали у різні терміни культивування (з 1 по 5 добу) за показниками життєздатності: виживання клітин, мітотична активність та гетерогенність популяції клітин за індексом багатоядерних клітин – полікаріоцитів. Одночасно в інтактних та дослідних культурах клітин на протоковому цитофлюориметрі FACStar Plus фірми “Becton Dickinson” (США) визначали апоптоз. Розміри бульбашок силікону визначали та оцінювали на площі 1 см² за допомогою метрометричної лінійки-шаблону з об’єктами заданого розміру, з використанням мікроскопа фірми Carl Zeiss “Axioplan” при збільшенні у 1000 разів. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента та за допомогою пакетів прикладних програм Microsoft Excel та Biostat.

Результати та обговорення.

В інтактному контролі клітини лінії L929 утворюють щільний моношар з типових фібробластоподібних клітин веретеноподібної, округлої або овальної форми з двома або більше відростками. В цитоплазмі більшості клітин присутні світлі вакуолі та маленькі гранули. Ядра клітин відносно великі, зустрічаються окремі двоядерні, а також гіперхромні клітини. У полі зору спостерігаються 2–5 клітин на стадії поділу (рис. 1, А). Для інтактних клітин характерне збільшення проліферативної активності впродовж 1–5 доби культивування (фаза логарифмічного росту) з поступовим виходом на плато на 5–6-ту добу (фаза стаціонарного росту). Щільність моношару клітин у ці терміни є найвищою. На 3-ю добу культивування спостерігається максимум мітотичної активності. У подальшому мітотичний індекс зменшувався за рахунок контактного інгібування мітозу та конфлуентного стану культури клітин. Індекс гігантських полікаріоцитів в інтактному контролі становив 8–17%.

За умов інкубації клітин з зависом бульбашок емульгованої СО було виявлено зменшення виживання клітин при збереженій чи навіть підвищеній їх мітотичній активності (рис. 2).

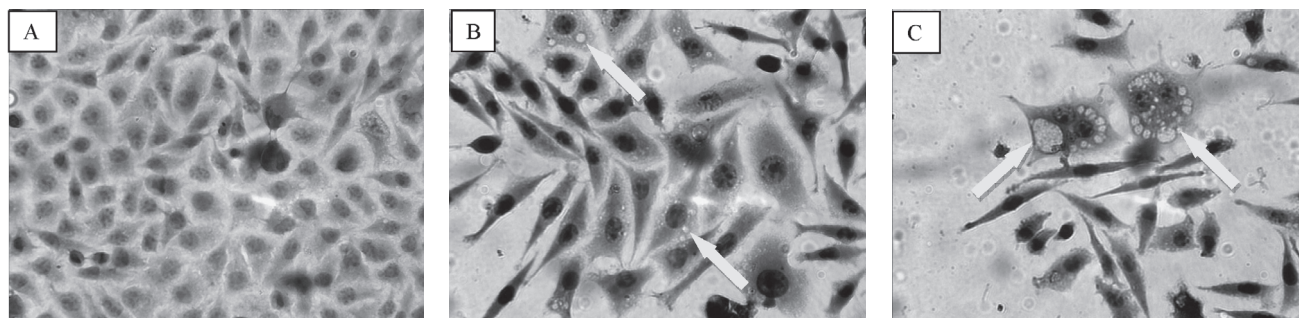


Рис. 1. Культура клітин лінії L929 при інкубації з бульбашками емульгованої СО на 4-ту добу культивування: А – інтактний контроль; В – інкубація з СО, спостерігається зменшення щільності моношару та фагоцитоз дрібних бульбашок СО клітинами L929; С – відмічається фагоцитоз дрібних бульбашок СО полікаріоцитами. Збільшення $\times 1000$.

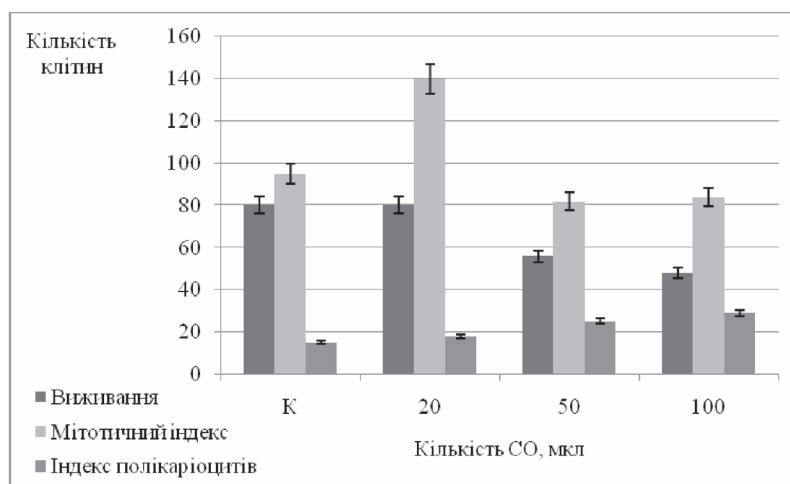


Рис. 2. Показники життєздатності клітин лінії L929 при інкубації з бульбашками емульгованої СО у різному об'ємі на 4-ту добу культивування.

За даними дослідження на 4-ту добу культивування спостерігалось зниження щільності клітинного моношару, що відповідає зниженню виживання клітин. Водночас спостерігалися явища фагоцитозу (рис. 1, В).

Бульбашки СО розміром 0,1 мкм та менше реєструвалися в цитоплазмі клітин із збереженням клітинної мембрани. Клітини в основному зберігали свою форму, проте збільшувалися у розмірах. Множинні та більші за розміром бульбашки емульгованої СО були зареєстровані у цитоплазмі полікаріоцитів, які також проявляли фагоцитарну активність (рис. 1, С). Ймовірно, фагоцитовані нерозчинні бульбашки емульгованої СО порушували метаболізм клітин лінії L929, знижуючи в такий спосіб їхнє виживання.

Трабекулярні клітини, які є одним із найчисельніших структурних елементів трабекулярної сітки, володіють високою фагоцитарною активністю [12]. Протягом життя вони фагоцитують зерна пігменту та інші дрібні частини. Базуючись на даних проведеного експерименту, можна висунути гіпотезу, що трабекулярні клітини фагоцитують бульбашки емульгованої СО. Це може призводити до порушення клітинного метаболізму, збільшення клітин у розмірах та звуження за рахунок цього просвітів трабекулярної сітки.

Висновки.

1. Інкубація клітин лінії L929 з бульбашками емульгованої СО призводить до зниження виживання клітин та зменшення щільності моношару культури.

2. Фагоцитоз бульбашок емульгованої СО розміром 0,1 мкм та менше клітинами лінії L929 сприяв збільшенню розмірів клітин та порушенню їхнього метаболізму із зниженням виживання культури.

3. Виявлення бульбашок емульгованої СО за допомогою гоніоскопії після оперативних втручань з приводу відшарування сітківки у пацієнтів з МВС може служити маркером наявного фагоцитозу в трабекулярній системі з порушенням відтоку вологи передньої камери, за рахунок звуження просвітів трабекул.

Рецензент: чл.-кор. НАМН України, д.мед.н., професор Жабоедов Г.Д.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Вит В.В. Строение зрительной системы человека / Вит В.В. // Монография, "Астропринт", Одеса, 2003.
2. Дьяконова Л.П. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) // М.: Изд-во "Спутник+", 2009. – 656 с.
3. Aaberg T.M. Late complications of pars plana vitreous / Aaberg TM, Van Horn D // Br J Ophthalmol, 1978. – P.136-149.
4. Abrams G.W. Dynamics of intravitreal sulphur hexafluoride gas / Abrams GW, Edelhauser H.F., Aaberg TM, Hamilton LH // Invest Ophthalmol. Nov; Vol 13 No11. 1974-P. 863-8.
5. Anderson N. G. Incidence of Intraocular pressure spike and other Adverse events after vitreoretinal surgery /

Anderson N. G., Finemand M.S., Brown GC. // *Ophthalmology* Vol 113, No1, 2006. – P. 42-47.

6. Barr C.C. Post operative intraocular pressure abnormalities in the Silicone Study: Silicone study Report 4 / Barr C.C., Lai M.Y., Lean J.S. et al. // *Ophthalmology*, Vol 100, 1993.- C.1629-35.

7. E. L. Greve, F. Furuno Myopia and glaucoma // *Graefe's Archive For Clinical And Experimental Ophthalmology* Volume 213, Number 1, 33-41.

8. Ichhpujani P. Silicone oil induced glaucoma: a review/ Ichhpujani P., Jindal A., Jay Katz L., Anna V. Goldberg // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009.- Vol.247. – P. 1585-93.

9. X. F. Lin Treatment of glaucoma secondary to silicone oil retention / X. F. Lin, L. Y. Liang, M. K. Lin, Z. H. Yuan // *Retina Philadelphia Pa*, 2005.- P. 232-245.

10. L. Lytvynchuk The frequency of silicon oil induced glaucoma after pars plana vitrectomy / MD L. Lytvynchuk, MD, PhD A. Sergienko, MD I. Kozlovska, Ph.D, Dr. Biol. Sci. Galina Y. Lavrenchuk, MD O. Fylypchuk, V. Siriachenko // 11th European Vitreoretinal Society Meeting, 2011.- P.131.

11. D. Minckler Silicone oil glaucoma / D. Minckler // *Journal of Glaucoma*, 2001.- P. 87-98.

12. Rohen J.W., van der Zypen E. The phagocytic of the trabecular meshwork endothelium: An electron microscopic study of the vervet (*Cercopithecus aethiops*) // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*.-1968.-Vol.175.-P.143-154.

13. J. Valone Emulsified anterior chamber silicone oil and glaucoma / J. Valone, M. McCarthy // *Ophthalmology*, 1994.- P. 125-135.

14. Gedde S.J. Management of glaucoma after retinal detachment surgery/ Gedde S.J. // *Ophthalmol*, Vol. 13, 2002.-P.103-109.

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO КЛЕТОЧНЫХ ЭФФЕКТОВ ЭМУЛЬГИРОВАННОГО СИЛИКОНОВОГО МАСЛА ПОСЛЕ ОПЕРАЦИЙ ПО ПОВОДУ ОТСЛОЙКИ СЕТЧАТКИ У ПАЦИЕНТОВ С МИОПИЕЙ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ

Литвинчук Л.М.¹, Сергиенко А.Н.¹, Лавренчук Г.И.²

¹ Киевская городская клиническая офтальмологическая больница "Центр микрохирургии глаза", г. Киев, Украина

² Государственное учреждение "Научный центр радиационной медицины НАМН Украины", г. Киев, Украина

Резюме: Повышение риска развития "силиконовой" глаукомы у пациентов с миопией высокой степени после задней закрытой витректомии связано с особенностями строения переднего отрезка глаза. Изучение взаимодействия пузырьков эмульгированного силиконового масла (СМ) со структурами трабекулярной сетки на клеточном уровне остается актуальным. Клеточные эффекты пузырьков эмульгированного СМ изучали при культивировании их с культурой перевивных клеток линии L929, как модели витальной клетки in vitro. Было установлено, что клетки линии L929 фагоцитируют пузырьки СМ размером 0,1 мкм и меньше. Как следствие, клетки увеличиваются в размере, плотность их монослоя уменьшается, нарушается их метаболизм и снижается выживание клеток. Исходя из данных исследования можно предположить, что трабекулярные клетки фагоцитируют пузырьки эмульгированного СМ, увеличиваются в размере, за счет чего сужается просвет трабекулы с возможным повышением внутриглазного давления. Выявление пузырьков СМ при гониоскопии у пациентов с миопией высокой степени может служить маркером наличия фагоцитоза в трабекулярной системе и ухудшения оттока влаги передней камеры.

Ключевые слова: "силиконовая" глаукома, миопия высокой степени, пузырьки эмульгированного силиконового масла, культура клеток линии L929, фагоцитоз, клетки трабекулы.

CELLULAR EFFECTS STUDY IN VITRO OF EMULSIFIED SILICON OIL AFTER RETINAL DETACHMENT SURGERIES IN PATIENTS WITH HIGH GRADE MYOPIA

L. Lytvynchuk¹, A. Sergienko¹, G. Lavrenchuk²

¹ Kyiv Eye Microsurgery Center, Kyiv, Ukraine

² State Institution "Research Center for Radiation Medicine of Academy of Medical Sciences of Ukraine" Laboratory of Cell Radiobiology, Kyiv, Ukraine

Summary. High risk of silicon oil induced glaucoma development in patients with high grade myopia after retinal detachment surgeries is present due to structural specifics of anterior chamber. Study of interaction between emulsified silicon oil (SO) bubbles and trabecular meshwork on cellular level is of interest at this time. Cellular effects of emulsified silicon oil bubbles were studied during cultivation with cell strain L929, as a model of vital cell in vitro. It was discovered that SO bubbles of size 0,1 mkm have been phagocytised by mentioned cells. As a sequence the cells were enlarged in size, the density of cellular monolayer was decreased, cellular metabolism was damaged and its survival was decreased as well. Following our data it is possible to assume that emulsified SO bubbles can be phagocytised by trabecular cells, leading to cell enlargement and narrowing of trabecular spaces, causing elevation of intraocular pressure. SO bubbles detection using gonioscopy in patients with high grade myopia can mark the initiation of phagocytosis in trabecular meshwork and lack of aqueous humor outflow.

Keywords: silicon oil induced glaucoma, high grade myopia, emulsified silicon oil bubbles, cell strain L929, phagocytosis, trabecular cells.